



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

| | | |
|--|-----------|---|
| (51) Internationale Patentklassifikation 6 : C12N 15/82, C07K 14/415, C12Q 1/68, C07K 16/16, C12N 1/21, 9/26, A01H 5/00 | A1 | (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/04722 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 5. Februar 1998 (05.02.98) |
| (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/04153 (22) Internationales Anmeldedatum: 30. Juli 1997 (30.07.97) (30) Prioritätsdaten: 196 30 738.4 30. Juli 1996 (30.07.96) DE 196 41 302.8 7. Oktober 1996 (07.10.96) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): UNIVERSITÄT HEIDELBERG [DE/DE]; Grabengasse 1, D-69117 Heidelberg (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): RAUSCH, Thomas [DE/DE]; Alte Eppelheimer Strasse 35-1, D-69115 Heidelberg (DE). KRAUSGRILL, Silke [DE/DE]; Feststrasse 15, D-60316 Frankfurt (DE). GREINER, Steffen [DE/DE]; Leibnizstrasse 57, D-63071 Offenbach (DE). (74) Anwalt: MÜLLER-BORE & PARTNER; Grafinger Strasse 2, D-81671 München (DE). | | (81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i> |
| (54) Title: INVERTASE INHIBITOR (54) Bezeichnung: INVERTASE-INHIBITOR (57) Abstract <p>The present invention concerns a nucleic acid which contains at least one nucleic acid sequence coding for a polypeptide, where the polypeptide is enabled to reduce the enzymatic activity of an invertase, the polypeptide itself, as well as transgenic plants which contain this nucleic acid sequence. Moreover, the present invention concerns processes for producing such transgenic plants with reduced, storage-related sucrose loss.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die vorliegende Erfindung betrifft eine Nukleinsäure, die mindestens eine für ein Polypeptid kodierende Nukleinsäuresequenz enthält, wobei das Polypeptid zur Reduzierung der enzymatischen Aktivität einer Invertase befähigt ist, das Polypeptid selbst sowie transgene Pflanzen, die diese Nukleinsäuresequenz enthalten. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung Verfahren zur Herstellung von solchen transgenen Pflanzen mit reduziertem, lagerungsbedingtem Saccharose-Verlust.</p> | | |

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

| | | | | | | | |
|----|------------------------------|----|-----------------------------------|----|---|----|--------------------------------|
| AL | Albanien | ES | Spanien | LS | Lesotho | SI | Slowenien |
| AM | Armenien | FI | Finnland | LT | Litauen | SK | Slowakei |
| AT | Österreich | FR | Frankreich | LU | Luxemburg | SN | Senegal |
| AU | Australien | GA | Gabun | LV | Lettland | SZ | Swasiland |
| AZ | Aserbaidschan | GB | Vereinigtes Königreich | MC | Monaco | TD | Tschad |
| BA | Bosnien-Herzegowina | GE | Georgien | MD | Republik Moldau | TG | Togo |
| BB | Barbados | GH | Ghana | MG | Madagaskar | TJ | Tadschikistan |
| BE | Belgien | GN | Guinea | MK | Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien | TM | Turkmenistan |
| BF | Burkina Faso | GR | Griechenland | | | TR | Türkei |
| BG | Bulgarien | HU | Ungarn | ML | Mali | TT | Trinidad und Tobago |
| BJ | Benin | IE | Irland | MN | Mongolei | UA | Ukraine |
| BR | Brasilien | IL | Israel | MR | Mauritanien | UG | Uganda |
| BY | Belarus | IS | Island | MW | Malawi | US | Vereinigte Staaten von Amerika |
| CA | Kanada | IT | Italien | MX | Mexiko | UZ | Usbekistan |
| CF | Zentralafrikanische Republik | JP | Japan | NE | Niger | VN | Vietnam |
| CG | Kongo | KE | Kenia | NL | Niederlande | YU | Jugoslawien |
| CH | Schweiz | KG | Kirgisistan | NO | Norwegen | ZW | Zimbabwe |
| CI | Côte d'Ivoire | KP | Demokratische Volksrepublik Korea | NZ | Neuseeland | | |
| CM | Kamerun | | | PL | Polen | | |
| CN | China | KR | Republik Korea | PT | Portugal | | |
| CU | Kuba | KZ | Kasachstan | RO | Rumänien | | |
| CZ | Tschechische Republik | LC | St. Lucia | RU | Russische Föderation | | |
| DE | Deutschland | LI | Liechtenstein | SD | Sudan | | |
| DK | Dänemark | LK | Sri Lanka | SE | Schweden | | |
| EE | Estland | LR | Liberia | SG | Singapur | | |

"Invertase-Inhibitor"

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Nukleinsäure, die mindestens eine für ein Polypeptid kodierende Nukleinsäuresequenz enthält, wobei das Polypeptid zur Reduzierung der enzymatischen Aktivität einer Invertase befähigt ist, das Polypeptid selbst sowie transgene Pflanzen, die diese Nukleinsäuresequenz enthalten. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung Verfahren zur Herstellung von solchen transgenen Pflanzen mit reduziertem, lagerungsbedingtem Saccharose-Verlust.

Während der Lagerung von Zuckerrüben (*Beta vulgaris*), im Zeitraum zwischen Ernte und Verarbeitung, kommt es durch Atmung bzw. Saccharose-Metabolismus zu einem Saccharose-Verlust von etwa 0,02% pro Tag. Mit diesem Verlust geht ferner eine signifikante Qualitätsminderung infolge der Zunahme reduzierender Zucker, insbesondere Fructose und Glucose, einher (Burba, M. (1976) Atmung und Saccharosestoffwechsel lagernder Zuckerrüben. Zeitschrift für die Zuckerindustrie 26: 647-658). Der erste metabolische Schritt beim Saccharose-Abbau während der Rübenlagerung ist die enzymatische Hydrolyse durch eine vakuoläre Invertase. Dieses Enzym wird in Rübengewebe nach Verwundung *de novo* synthetisiert (Milling, R.J., Leigh, R.A., Hall, J.L. (1993) Synthesis of a vacuolar acid invertase in washed discs of storage root tissue of red beet (*Beta vulgaris* L.). J. Exp. Bot. 44: 1687-1694). Da die Hauptmasse der Rüben-Saccharose in den Zellvakuolen lokalisiert ist, spielt die (wund-)induzierte vakuoläre Invertase eine zentrale Rolle für den lagerungsbedingten Saccharose-Verlust.

Es gibt zur Zeit keine befriedigende Lösung für das Problem lagerungsbedingter Saccharose-Verluste (Burba, 1976). Die wichtigsten Maßnahmen im Stand der Technik bestehen in der Einhaltung niedriger Temperaturen (unter 12°C) und

definierter Luftfeuchte (zwischen 90 und 96%). Jedoch sind alle bisher eingesetzten Maßnahmen zur Verminderung der lagerungsbedingten Verluste unbefriedigend.

- 5 Ein lagerungsbedingter Umsatz von Saccharose zu den Hexosen Glucose und Fructose und somit ein Saccharose-Verlust findet auch während des sogenannten "cold sweetening" bei Kartoffeln statt. Infolge der Kältebehandlung wird in den Kartoffelknollen eine vakuoläre Invertase induziert, die das Verhältnis von Saccharose zu Hexosen bestimmt (Zrenner, R., Schüler, K., Sonnewald, U.
- 10 (1996) Soluble acid invertase determines the hexose-to-sucrose ratio in cold-stored potato tubers. *Planta* 198: 246-252). Die Bildung der Hexosen als Folge des "cold sweetening" führt zu Qualitätseinbußen bei der Herstellung von beispielsweise Pommes frites.
- 15 Tomatenfrüchte (*Lycopersicon esculentum* Mill.) weisen einen hohen Wassergehalt auf. Dieser ist teilweise durch die osmotisch wirksamen endogenen Zucker (Saccharose und Hexosen) bedingt. Eine Erniedrigung des Gesamtzucker-gehaltes durch Hemmung der Invertase-vermittelten Saccharose-Hydrolyse führt zu kleineren wasserärmeren Früchten (Klann, E.M., Hall, B., Bennett, A.B.
- 20 (1996) Antisense acid invertase (TIV1) gene alters soluble sugar composition and size in transgenic tomato fruit. *Plant Physiology* 112: 1321-1330). Eine Verringerung des Wassergehaltes der Tomatenfrüchte führt zu einer Einsparung von Energiekosten bei der Herstellung von Fruchtkonzentraten (z.B. Ketchup). Da die Reduktion der vakuolären Invertase-Aktivität über Invertase-*antisense* Ex-
- 25 pression auf Grund des Vorkommens verschiedener Isoformen nur unvollständig gelingt, könnte die transgene Einführung eines Invertaseinhibitors große Vorteile mit sich bringen, insbesondere wenn dieser verschiedene Isoformen gleichermaßen hemmt.
- 30 Somit liegt der vorliegenden Erfindung die Aufgabe zugrunde, ein neues System bereitzustellen, das im wesentlichen keine lagerungsbedingten Saccharose-Verluste in Pflanzen hervorruft.

Diese Aufgabe wird durch die in den Patentansprüchen gekennzeichneten Gegenstände der vorliegenden Erfindung gelöst.

5 Ein erster erfindungsgemäßer Gegenstand betrifft eine Nukleinsäure, die mindestens eine für ein Polypeptid kodierende Nukleinsäuresequenz enthält, wobei das Polypeptid zur Reduzierung bzw. Erniedrigung der enzymatischen Aktivität einer Invertase befähigt ist.

10 Die Begriffe "Nukleinsäure" und "Nukleinsäuresequenz" bedeuten natürliche oder halbsynthetische oder synthetische oder modifizierte Nukleinsäuremoleküle aus Desoxyribonukleotiden und/oder Ribonukleotiden und/oder modifizierten Nukleotiden.

15 Der Begriff "Polypeptid" umfaßt natürlich vorkommende Polypeptide und rekombinante Polypeptide. Rekombinante Polypeptide bezeichnen ein mit molekularbiologischen Techniken hergestelltes Konstrukt, dem die natürliche DNA des originalen Genoms bzw. die natürliche DNA, modifiziert mit einer fremden DNA-Sequenz, zugrundeliegt, und rekombiniert werden kann, z.B. mit Plasmiden, und in einem geeigneten Wirtssystem repliziert und exprimiert werden kann.

20 Der Ausdruck "ein zur Reduzierung der enzymatischen Aktivität einer Invertase befähigtes Polypeptid" bedeutet ein Polypeptid, welches in Folge der Bindung an eine Invertase deren enzymatische Aktivität reduziert, wobei bei ausreichender Menge des Inhibitorproteins eine vollständige Inhibition möglich ist. Vorzugsweise soll durch die Inhibitorexpression in der transgenen Pflanze eine etwa
25 90%ige Inhibition der vakuolären Invertase erreicht werden.

30 In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die Invertase in einer Pflanzenzelle vakuolär lokalisiert. In einer anderen Ausführungsform ist die Invertase in der Zellwand lokalisiert. In einer weiteren Ausführungsform ist die Invertase im Cytosol lokalisiert. Die Invertase stammt vorzugsweise aus der Zuckerrübe, der Kartoffel oder der Tomate.

5 In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfaßt die Nukleinsäure die in Figuren 1 (SEQ ID Nr. 1), 3 (SEQ ID Nr. 2), 12 (SEQ ID Nr. 3) und 14 (SEQ ID Nr. 4) gezeigte Nukleinsäuresequenzen oder Abschnitte bzw. Fragmente davon sowie Nukleinsäuresequenzen, die mit den komplementären Sequenzen der in Fig. 1, 3, 12 oder 14 gezeigten Nukleinsäuresequenzen oder Abschnitten bzw. Fragmenten davon hybridisieren können.

10 In einer anderen Ausführungsform enthält die erfindungsgemäße Nukleinsäure eine weitere, für eine Targeting-Sequenz kodierende Nukleinsäuresequenz. Der Begriff "Targeting-Sequenz" bedeutet eine Aminosäuresequenz, welche die zelluläre Zielsteuerung in ein definiertes zelluläres Kompartiment vermittelt, beispielsweise die Zielsteuerung in die Vakuole.

15 In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfaßt die Targeting-Sequenz die vakuoläre Targeting-Sequenz des Gerstenlektins mit folgender Aminosäuresequenz:

LEGVFAEIAASNSTLVAE

20 In einer anderen Ausführungsform enthält die erfindungsgemäße Nukleinsäure eine weitere, für ein Signalpeptid kodierende Nukleinsäuresequenz. Der Begriff "Signalpeptid" bedeutet eine hydrophobe Aminosäuresequenz, die vom Signal-erkennungspartikel (SRP) erkannt wird. Das SRP vermittelt die Synthese des Gesamtpolypeptids am rauen endoplasmatischen Reticulum (ER), mit der Folge, daß das entstehende Polypeptid in das Lumen des ER entlassen wird.

25 In einer weiteren Ausführungsform enthält die erfindungsgemäße Nukleinsäure eine für eine ER-Retentionssequenz kodierende Nukleinsäuresequenz.

30 In einer bevorzugten Ausführungsform stammt das Signalpeptid von einer Invertase, vorzugsweise von der Zellwand-Invertase aus Tabak.

In einer anderen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung enthält die Nu-

kleinsäure eine weitere Nukleinsäuresequenz, welche einen zur Expression in Pflanzen geeigneten Promotor umfaßt. Dieser Promotor bzw. Promotorsequenz stammt vorzugsweise aus der gleichen Pflanze wie die Invertase. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist der Promotor ein Kartoffel- oder Zuckerrüben-spezifischer Promotor.

Zusammenfassend kann die erfindungsgemäße Nukleinsäure die vorstehend definierte, das Polypeptid kodierende Nukleinsäuresequenz und gegebenenfalls die vorstehend definierte, eine Targeting-Sequenz kodierende Nukleinsäuresequenz und/oder die ein Signalpeptid kodierende Nukleinsäuresequenz und/oder den vorstehend definierten Promotor umfassen, wobei vorzugsweise alle eine Aminosäuresequenz kodierenden Nukleinsäuresequenzen im Leserahmen angeordnet sind und entsprechend dem genetischen Code degeneriert sein können.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Vektor, der die vorstehend definierte, erfindungsgemäße Nukleinsäure zur Expression des rekombinanten Polypeptids in prokaryotischen oder eukaryotischen Wirtszellen enthält. Der erfindungsgemäße Vektor kann vorzugsweise geeignete regulatorische Elemente, wie Promotoren, Enhancer, Terminationssequenzen, enthalten. Der erfindungsgemäße Vektor kann beispielsweise ein Expressionsvektor oder ein Vektor zur vorzugsweise stabilen Integration der erfindungsgemäßen Nukleinsäure in das genetische Material einer Wirtszelle sein. Ein geeignetes Expressionssystem umfaßt beispielsweise das Ti-Plasmid oder ein binäres Plasmidsystem in *Agrobacterium tumefaciens* als Vektor zur stabilen Integration der erfindungsgemäßen Nukleinsäure in das genetische Material einer Pflanze. Weiterhin kann die erfindungsgemäße Nukleinsäure z.B. auch durch das Ri-Plasmid von *Agrobacterium rizogenes*, durch direkten Gentransfer mittels Polyethylenglykol, durch Elektroporation oder durch Partikelbeschuß in das genetische Material einer Pflanze eingeführt werden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Wirtszelle, welche die erfindungsgemäße Nukleinsäure oder den erfindungsgemäßen Vektor enthält. Geeignete Wirtszellen sind beispielsweise Prokaryonten, wie *E. coli*, oder euka-

ryotische Wirtszellen wie *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris* und *Baculovirus*-infizierte Insektenzellen.

5 Ein weiterer erfindungsgemäßer Gegenstand ist das Polypeptid selbst, das von der vorstehend definierten Nukleinsäuresequenz kodiert wird, wobei die Nukleinsäuresequenz entsprechend dem genetischen Code degeneriert sein kann. Das erfindungsgemäße Polypeptid enthält mindestens einen zur Reduzierung der enzymatischen Aktivität einer Invertase befähigten Aminosäure-Sequenzabschnitt. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfaßt das Polypeptid 10 die in Figuren 1 (SEQ ID Nr. 5), 3 (SEQ ID Nr. 6), 12 (SEQ ID Nr. 7) und 14 (SEQ ID Nr. 8) gezeigten Aminosäuresequenzen oder Abschnitte bzw. Fragmente davon. Ferner umfaßt der Begriff "Polypeptid" beispielsweise Isoformen aus der gleichen Pflanze sowie homologe Inhibitor-Sequenzen anderer Pflanzenarten, 15 wobei die Homologie auf Proteinebene vorzugsweise $> 70\%$ ist.

In einer erfindungsgemäßen Ausführungsform enthält das Polypeptid weiter eine am C-Terminus des Polypeptids angeordnete Aminosäuresequenz, welche eine vorstehend definierte Targeting-Sequenz und/oder eine ER-Retentionssequenz, 20 beispielsweise "KDEL", umfaßt, und/oder eine am N-Terminus des Polypeptids angeordnete Aminosäuresequenz, welche ein vorstehend definiertes Signalpeptid umfaßt.

25 Die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz, der erfindungsgemäße Vektor sowie das erfindungsgemäße Polypeptid können durch im Stand der Technik bekannte Verfahren hergestellt werden.

30 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine transgene Pflanze, die mindestens die vorstehend definierte, erfindungsgemäße Nukleinsäure enthält.

Der Begriff "transgene Pflanze" bzw. "Pflanze" umfaßt die ganze Pflanze als solche sowie deren Teile, wie Wurzel, Stengel, Blatt, organspezifisches Gewebe

oder Zellen, deren vermehrungsfähiges Material, insbesondere Samen, und deren Keimlinge. Ferner umfaßt dieser Begriff Stärkeknochen und -wurzeln, beispielsweise Kartoffel, Batate und Maniok, und Zuckerpflanzen, beispielsweise Zuckerrohr und Zuckerrübe, sowie Tomate und Mais.

5

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist der Wildtyp der transgenen Pflanze eine Zuckerrübe, eine Tomate oder eine Kartoffel.

10

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen transgenen Pflanze, worin eine Pflanzenzelle durch stabile Integration der vorstehend definierten Nukleinsäure in das genetische Material transformiert wird und die transformierte Pflanzenzelle zur transgenen Pflanze regeneriert wird. Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzen sind im Stand der Technik bekannt.

15

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung der vorstehend definierten Nukleinsäure zur Herstellung einer transgenen Pflanze mit reduziertem lagerungsbedingtem Saccharose-Verlust.

20

Erfindungsgemäß kann festgestellt werden, daß die Verminderung lagerungsbedingter Saccharose-Verluste durch die Expression des vorstehend definierten Polypeptids als "Invertase-Inhibitorprotein" in transgenen Pflanzen überraschenderweise ein hochspezifisches, umweltschonendes Verfahren zur Verbesserung von beispielsweise der Zuckerrüben- bzw. Kartoffelknollenqualität darstellt. Für

25

die Zuckerrübe wird durch die Effizienzsteigerung der Zuckergewinnung bei vorgegebener Ertragshöhe eine Verminderung des Produktionsmitteleinsatzes ermöglicht. Im Fall der Kartoffel wird durch Reduktion der Kälte-induzierten Hexose-Bildung die Produktqualität der Kartoffeln, insbesondere für die Herstellung von Pommes frites, erhöht. Im Fall der Tomate wird durch die Reduktion

30

osmotisch wirksamer Hexosen der Wassergehalt der Tomatenfrucht erniedrigt.

Durch die Kombination der den Invertase-Inhibitor kodierenden Nukleinsäuresequenz mit einer, eine geeigneten Targeting-Sequenz kodierenden Nukleinsäuresequenz

quenz kann beispielsweise eine korrekte vakuoläre Zielsteuerung des exprimierten Invertase-Inhibitors in die Vakuole erreicht werden und somit die Expression des Invertase-Inhibitors räumlich begrenzt werden. Ferner kann durch Verwendung von beispielsweise rüben- oder knollenspezifischen Promotoren die Expression des Invertase-Inhibitors zeitlich begrenzt werden.

Die Figuren zeigen:

Figur 1 zeigt die den Invertase-Inhibitor kodierende c-DNA aus *Nicotiana tabacum* mit einer Länge von 1701 bp, wobei der offene Leserahmen ("open reading frame", "ORF") 477 bp mit Startnukleotid 1 umfaßt. Der von dieser Nukleinsäuresequenz kodierte Invertase-Inhibitor weist 159 Aminosäuren mit einem errechneten Molekulargewicht M_r von 18915 und einem errechneten isoelektrischen Punkt von 10,13 auf.

Figur 2 zeigt die schematische Herstellung des Inhibitor-Konstrukts einer bevorzugten erfindungsgemäßen Ausführungsform zur Transformation von Pflanzen.

Figur 3 zeigt eine weitere, für einen in der Zellwand von Tabakzellen lokalisierten Invertase-Inhibitor kodierende cDNA mit einer Länge von 631 bp (ohne poly-A). Die genutzte Signalsequenz für die Sekretion in die Zellwand ist fett markiert. Die Schnittstelle, welche mit dem ansequenzierten N-Terminus des reifen Proteins identisch ist, ist durch einen Pfeil markiert.

Figur 4 zeigt die Expression des rekombinanten Tabak-Invertaseinhibitors in *E.coli*. Die in Figur 3 dargestellte cDNA wurde in den pQE-Vektor (Qiagen, Hilden, Deutschland) kloniert. Das rekombinante Protein wurde als his-tagged Fusionsprotein exprimiert. A: M, Molekulargewichtsmarker; 1: Bakterien nicht-induziert; 2: Bakterien mit IPTG induziert; 3: Affinitätschromatographisch (Ni-NTA) gereinigter rekombinanter Tabak-Invertaseinhibitor. B: Western Blot-Analyse der Fraktionen 1-3 aus A mit einem gegen den Inhibitor gerichteten polyklonalen Antiserum.

Figur 5 zeigt die dosisabhängige Hemmung der Zellwand-Invertase aus Tabak durch das rekombinante Inhibitorprotein. Die Punkte zeigen die Hemmung nach Vorinkubation beider Proteine ohne Saccharose, die Vierecke zeigen die Hemmung ohne Vorinkubation.

5

Figur 6 zeigt die Induktion der sauren Invertaseaktivität in Zuckerrüben nach Verwundung.

Figur 7 zeigt die Hemmung der Gesamt-Invertaseaktivität aus verwundeten Zuckerrüben durch aus Tabakzellkulturen gewonnenem Invertaseinhibitor.

10

Figur 8 zeigt die Hemmung der Zellwand-Invertase aus der Zuckerrübe durch den rekombinanten Tabak-Invertaseinhibitor (siehe Figuren 3-5). Die Punkte zeigen die Hemmung nach Vorinkubation beider Proteine ohne Saccharose, die Vierecke zeigen die Hemmung ohne Vorinkubation.

15

Figur 9 zeigt die Hemmung der Gesamt-Invertaseaktivität aus verwundeten Zuckerrüben (vakuoläre Invertase + Zellwand-Invertase) durch den rekombinanten Tabak-Invertaseinhibitor (siehe Figuren 3-5). Die Punkte zeigen die Hemmung nach Vorinkubation beider Proteine ohne Saccharose, die Vierecke zeigen die Hemmung ohne Vorinkubation.

20

Figur 10 zeigt die immunologische Identifizierung der vakuolären Invertase (VI) aus Tomatenfrüchten, sowie den Nachweis eines zum Tabak-Invertaseinhibitor homologen Tomateninhibitors (INH). Beide Proteine wurden mit polyklonalen, monospezifischen Antiseren detektiert. Die VI zeigt nach SDS-PAGE und Western Blot zwei Spaltprodukte von 52 und 20 KD. Die VI bindet vollständig an Concanavalin A-Sepharose, wohingegen der Tomaten-Invertaseinhibitor zu etwa gleichen Anteilen in der ConA-bindenden und der ConA-nichtbindenden Fraktion vorliegt.

25

30

Figur 11 zeigt die Hemmung der Tomaten-VI durch den rekombinanten Tabak-Invertaseinhibitor (siehe Figuren 3-5). Die Punkte zeigen die Hemmung nach

Vorinkubation beider Proteine ohne Saccharose, die Vierecke zeigen die Hemmung ohne Vorinkubation.

5 Figur 12 zeigt die Sequenz einer partiellen cDNA für den Tomaten-Invertaseinhibitor, die über RT-PCR aus Tomatenblüten-cDNA amplifiziert wurde.

Figur 13 zeigt den Vergleich von zwei (identischen) partiellen Tomaten-Invertaseinhibitor-Klonen mit dem Tabak-Invertaseinhibitor (siehe Figur 3).

10 Figur 14 zeigt die cDNA Sequenz eines cytosolischen Homologs zum Invertaseinhibitor-Klon aus Fig. 3. Das durch diesen Klon kodierte Protein ist zur Hemmung cytosolischer Invertasen befähigt.

15 Durch das nachfolgende Beispiel wird die vorliegende Erfindung näher erläutert.

Beispiel

20 Sämtliche, im folgenden Beispiel zur Anwendung kommenden Methoden für die Herstellung der erforderlichen Genkonstrukte entsprechen Standardverfahren molekularbiologischen Arbeitens (Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidmann, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. (1987-1996) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing). Der Arbeitsgang gliedert sich im wesentlichen in folgende Abschnitte:

- 25
- (1) Das Inhibitorprotein wird über selektive Salzelution des Zellwandproteins, zweifache Ionenaustauscherchromatographie und anschließende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese bis zur Homogenität gereinigt.
 - 30 (2) Das homogene Inhibitorprotein wird tryptisch verdaut und die erhaltenen Peptide des Inhibitorproteins werden über *Edman*-Abbau sequenziert.
 - (3) Ausgehend von den erhaltenen Peptidsequenzen werden degenerierte

Primer synthetisiert und mit ihrer Hilfe über PCR DNA-Fragmente der Inhibitor-cDNA aus Gesamt-cDNA amplifiziert.

- 5 (4) Aus Tabakzellkulturen wird eine cDNA-Bank (in einem Expressionsvektor; ZAP Express®, Fa. Stratagene) hergestellt.
- (5) Die erhaltenen Partialsequenzen der Inhibitor-cDNA (siehe (2)) werden für das Screening der cDNA-Bank eingesetzt.
- 10 (6) Der erhaltene Vollängenklon wird nach Expression in *E.coli* (Einklonierung in den pQE-Vektor der Fa. Qiagen) hinsichtlich seiner Funktion (Invertase-Inhibition) bestätigt.
- 15 (7) Der für das Inhibitorprotein kodierende Abschnitt des cDNA-Klons (Fig. 1) wird über PCR amplifiziert. Hierfür werden Primer mit Restriktionsschnittstellen eingesetzt, die die anschließende Ligation mit der Signal- und der Targeting-Sequenz erlauben. Am 5'-Ende wird mit der Signalsequenz, am 3'-Ende mit der Targeting-Sequenz für die Vakuole ligiert.
- 20 *Gewinnung der Signalsequenz:* Die Signalsequenz wird mittels PCR aus der cDNA der Tabak-Zellwand-Invertase (Greiner, S., Weil, M., Krausgrill, S., Rausch, T. (1995) Plant Physiology 108: 825-826) amplifiziert (Bereich: Met¹-Val²³). Hierfür werden Primer mit Restriktionsschnittstellen eingesetzt, die die anschließende Ligation mit der Inhibitor cDNA erlauben.
- 25 *Gewinnung der Targeting-Sequenz:* Die Targeting-Sequenz wird aus der cDNA für das Gerstenlektin amplifiziert (Bednarek, S.Y., Taikhel, N.V. (1991) Plant Cell 3: 1195-1206). Hierfür werden ebenfalls Primer mit Restriktionsschnittstellen eingesetzt, die die anschließende Ligation mit der Inhibitor cDNA erlauben.
- 30 Zur *sense*-Klonierung der Nukleinsäure aus Fig. 3 (SEQ ID Nr. 2) wird die gesamte Nukleinsäure mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen BamH I und Xba I aus dem pBK-CMV-Vektor (dieser generiert sich nach "in vivo excision" aus dem ZAP Express Phagen (Fa. Stratagene)) herausgeschnitten. Das erhaltene DNA-Fragment wird nun in einen BamH I/Xba I ge-

schnittenen binären Transformationsvektor ligiert und anschließend in Bakterien transformiert.

Zur *antisense*-Klonierung der Nukleinsäure aus Fig. 3 (SEQ ID Nr. 2) werden die Restruktionsendonukleasen BamH I und Kpn I verwendet. Ansonsten ist die Vorgehensweise die gleiche wie bei der *sense*-Klonierung.

Die *sense*- und *antisense*-Klonierung der Nukleinsäure aus Fig. 14 (SEQ ID Nr. 4) erfolgt analog.

Die so erhaltenen Konstrukte werden zum *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelten Gentransfer in Pflanzen (im Beispiel Zuckerrübe, Kartoffel und Tomaten) eingesetzt.

Die Einführung der vakuolären Targeting-Sequenz für die Nukleinsäuren aus Fig. 3 und 4 erfolgt wie für die Nukleinsäure aus Fig. 1 beschrieben.

(8) Das unter (7) genannte Genkonstrukt wird 5'-seitig mit einem rübenspezifischen Promotor ligiert und das erhaltene Konstrukt in einen binären Expressionsvektor einkloniert.

(9) Die Zielpflanze wird über eine geeignete, im Stand der Technik bekannte Transformationstechnik transformiert. Der Aufbau des für die Transformation benötigten Genkonstruktes ist in Fig. 2 dargestellt.

Gegen den in Tabakzellen exprimierten Invertaseinhibitor wurde ein Antiserum für das Screening einer cDNA-Bank hergestellt. Desweiteren wurden mit aus partiellen Aminosäuresequenzen abgeleiteten Oligonukleotiden PCR-Reaktionen zur Gewinnung einer homologen cDNA-Sonde durchgeführt. Außerdem wurde ein Oligo-Screening durchgeführt. Mit dem Oligo-Screening wurde der Klon in Fig. 1 isoliert. Über RT-PCR wurde ein 300 bp-Fragment amplifiziert, welches dann als Sonde für das Screening der cDNA-Bank eingesetzt wurde. Hierbei wurde der Klon in Fig. 3 isoliert. Letzterer wurde in *E. coli* als his-tagged Fusionsprotein exprimiert (Fig. 4). Das rekombinante Inhibitorprotein hemmt die Zellwand-Invertase aus Tabak, wobei für diese Invertase-Isoform ein partieller Substratschutz beobachtet wird (Fig. 5), der jedoch bei anderen vakuolären bzw.

in der Zellwand lokalisierten Invertasen nicht auftritt (s.u.). Außerdem wurde ein cytosolisch lokalisiertes Homolog zu dem in Fig. 3 dargestellten Inhibitorklon isoliert (Fig. 14). Das durch diesen Klon kodierte Protein kann als Inhibitor für cytosolische Invertasen wirken.

5

Die Invertase-Aktivität in verwundeten Zuckerrüben (Fig. 6) läßt sich durch das aus Tabakzellen isolierte (Fig. 7) Inhibitorprotein hemmen. Enzymkinetiken mit rekombinanten Tabak-Inhibitorprotein bestätigen, daß sowohl die Gesamt-Invertaseaktivität (Fig. 9) in verwundeten Zuckerrüben, wie auch die partiell gereinigte Zellwand-Invertase der Zuckerrübe (Fig. 8) durch den Invertaseinhibitor aus Tabak zu hemmen sind.

10

In Tomatenfrüchten wird in erster Linie vakuoläre Invertase exprimiert, die bei Auftrennung über SDS-PAGE in zwei Spaltprodukte zerfällt (52 und 20 KD; Fig. 10). Neben der vakuolären Invertase wird auch ein vermutlich im Zellwandraum lokalisierter Invertaseinhibitor von ca. 19 KD exprimiert, der mit dem Antiserum gegen den Tabak-Invertaseinhibitor kreuzreagiert (Fig. 10). Die aus Tomatenfrüchten isolierte vakuoläre Invertase wird ebenfalls durch den rekombinanten Tabak-Invertaseinhibitor gehemmt (Fig. 11). Die auffällige Sequenzhomologie einer über RT-PCR erhaltenen Tomaten cDNA-Partialsequenz mit der Sequenz des Tabak-Invertaseinhibitors (Fig. 12 und 13) stützt die Vermutung, daß der in Früchten exprimierte Tomaten-Invertaseinhibitor gegenüber der vakuolären Invertase kompartmentiert sein könnte (im Zellwandraum) und daher *in vivo* die vakuoläre Invertase nicht hemmt.

15

20

25

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß der apoplastische Tabak-Invertaseinhibitor (Fig. 3) nachgewiesenermaßen sowohl Zellwand-Invertasen wie auch vakuoläre Invertasen, insbesondere der Zuckerrübe und der Tomate, vollständig zu hemmen vermag. Das korrekte zelluläre Targeting vorausgesetzt, kann der Tabak-Invertaseinhibitor in transgenen Pflanzen (Zuckerrübe, Kartoffel, Tomate) somit zur Verminderung der vakuolären und/oder in der Zellwand lokalisierten Invertasen eingesetzt werden. Der cytosolisch lokalisierte Invertaseinhibitor (Fig. 14) reguliert cytosolische Invertasen. Auch deren Hemmung in

30

transgenen Pflanzen kann sich vorteilhaft auf das Saccharose/Hexose-Verhältnis auswirken.

Patentansprüche

1. Nukleinsäure, enthaltend mindestens eine für ein Polypeptid kodierende Nukleinsäuresequenz, wobei das Polypeptid zur Reduzierung der enzymatischen Aktivität einer Invertase befähigt ist.
5
2. Nukleinsäure nach Anspruch 1, wobei die Invertase in einer Pflanzenzelle vakuolär lokalisiert ist.
- 10 3. Nukleinsäure nach Anspruch 1, wobei die Invertase in einer Pflanzenzelle Zellwand-lokalisiert ist.
4. Nukleinsäure nach Anspruch 1, wobei die Invertase in einer Pflanzenzelle im Cytosol lokalisiert ist.
15
5. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Invertase aus der Zuckerrübe, der Kartoffel oder der Tomate stammt.
- 20 6. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 5, umfassend die in Figur 1 (SEQ ID Nr. 1), 3 (SEQ ID Nr. 2), 12 (SEQ ID Nr. 3) oder 14 (SEQ ID Nr. 4) gezeigte Nukleinsäuresequenz oder Abschnitte davon oder mit deren komplementären Sequenzen hybridisierende Nukleinsäuresequenzen.
- 25 7. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 6, weiter enthaltend mindestens eine für eine Targeting-Sequenz kodierende Nukleinsäuresequenz.
8. Nukleinsäure nach Anspruch 7, wobei die Targeting-Sequenz die vakuoläre Targeting-Sequenz des Gerstenlektins umfaßt.
- 30 9. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 8, weiter enthaltend mindestens eine für ein Signalpeptid kodierende Nukleinsäuresequenz.
10. Nukleinsäure nach Anspruch 9, wobei das Signalpeptid von einer Inver-

tase stammt.

5

11. Nukleinsäure nach Anspruch 9 oder 10, wobei das Signalpeptid von der Zellwand-Invertase aus Tabak stammt.

12. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 11, weiter enthaltend mindestens eine für eine ER-Retentionssequenz kodierende Nukleinsäuresequenz.

10

13. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 12, weiter enthaltend mindestens eine Nukleinsäuresequenz, welche einen zur Expression in Pflanzen geeigneten Promotor umfaßt.

15

14. Nukleinsäure nach Anspruch 13, wobei der Promotor aus der gleichen Pflanze stammt wie die Invertase.

15. Nukleinsäure nach Anspruch 13 oder 14, wobei der Promotor ein Kartoffel-, Tomaten-, oder Zuckerrüben-spezifischer Promotor ist.

20

16. Vektor, enthaltend die Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 15.

25

17. Wirtszelle, enthaltend die Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 15 oder den Vektor gemäß Anspruch 16.

18. Polypeptid, enthaltend mindestens einen zur Reduzierung der enzymatischen Aktivität einer Invertase befähigten Aminosäure-Sequenzabschnitt.

30

19. Polypeptid nach Anspruch 18, umfassend die in Figur 1 (SEQ ID Nr. 4), 3 (SEQ ID Nr. 6), 12 (SEQ ID Nr. 7) oder 14 (SEQ ID Nr. 8) gezeigte Aminosäuresequenz oder Fragmente davon.

20. Polypeptid nach Anspruch 18 oder 19, weiter enthaltend eine am C-

Terminus des Polypeptids angeordnete Aminosäuresequenz, welche eine Targeting-Sequenz und/oder ER-Retentionssequenz umfaßt.

- 5 21. Polypeptid nach Anspruch 20, wobei die Targeting-Sequenz die vakuoläre Targeting-Sequenz des Gerstenlektins umfaßt.
22. Polypeptid nach einem der Ansprüche 18 bis 21, weiter enthaltend eine am N-Terminus des Polypeptids angeordnete Aminosäuresequenz, welche ein Signalpeptid umfaßt.
- 10 23. Polypeptid nach Anspruch 22, wobei das Signalpeptid von einer Invertase stammt.
24. Polypeptid nach Anspruch 22 oder 23, wobei das Signalpeptid von der Zellwand-Invertase aus Tabak stammt.
- 15 25. Transgene Pflanze, enthaltend mindestens eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 15.
- 20 26. Transgene Pflanze nach Anspruch 25, deren Wildtyp eine Zuckerrübe ist.
27. Transgene Pflanze nach Anspruch 25, deren Wildtyp eine Kartoffel ist.
28. Transgene Pflanze nach Anspruch 25, deren Wildtyp eine Tomate ist.
- 25 29. Verfahren zur Herstellung einer transgenen Pflanze gemäß einem der Ansprüche 25 bis 28, worin eine Pflanzenzelle durch stabile Integration der Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 15 in das genetische Material transformiert wird und die transformierte Pflanzenzelle zur trans-
- 30 30. Verwendung der Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 15 zur Herstellung einer transgenen Pflanze mit reduziertem lagerungsbedingtem

Saccharose-Verlust.

1/14

Fig. 1 (Blatt 1)

10 20 30 40 50 60
ATGGGCGAGGAAAATGTCGTGCAGGTGATAACTCAGAACACACCCGAATTATCAAGCTGCT
M G E E N V V Q V I T Q N T P N Y Q A A

70 80 90 100 110 120
GGAAAGATGCTTGAAGAGAAAAGAAGGAATTTATTTTGGACTCCTTGTGCTGCATATTGT
G K M L E E K R R N L F W T P C A A Y C

130 140 150 160 170 180
ATTGATCGCATCCTTGAAGACTTTGTGAAAATAAAATGGGTCAGAGAATGCATGGAAAAA
I D R I L E D F V K I K W V R E C M E K

190 200 210 220 230 240
GCCCCAAAAATCACCAAGTTCATTTACAATAGTTTCTGGTTGTTAAGTCTCATGAAAAAA
A Q K I T K F I Y N S F W L L S L M K K

250 260 270 280 290 300
GAATTTACAGCTGGACAGGAACCTCTTGAACCCTCTTTTACTCGATATTCTTCAACCTTC
E F T A G Q E L L K P S F T R Y S S T F

310 320 330 340 350 360
GCTACTGTTTCAGAGCTTGTGACCACAGAAATGGTCTTAAGAGGATGTTCCAGTCAAAT
A T V Q S L L D H R N G L K R M F Q S N

370 380 390 400 410 420
AAATGGCTTTTCGTCCCGGTATTCAAAGCTGGAAGATGGTAAAGAGGTGGAGAAAATTGTA
K W L S S R Y S K L E D G K E V E K I V

430 440 450 460 470 480
CTAAATGCCACCTTCTGGAGGAAAATGCAGTATGTTAGGAAATCAGTGGACCCATTTTAG
L N A T F W R K M Q Y V R K S V D P F -

2/14

Fig. 1 (Blatt 2)

490 500 510 520 530 540
AAGTGCTTCAAAAAATCAATAGCAACGAAAGCCATTAATACCCTTCATTTACAACAATGT
K C F K K S I A T K A I N T L H L Q Q C

550 560 570 580 590 600
ATACCAGGCCAAACTTGCTGTCAAAACCAATCATAATGACGACGGGGCAATATCGGAAC
I P G K T C C Q N Q S - - R R G K Y R N

610 620 630 640 650 660
ATTTTGGATATCATAGACAGCCACTGGAATTCATTATCTCATCATCCTCTCTATCTAGCA
I L D I I D S H W N S L S H H P L Y L A

670 680 690 700 710 720
GCACACTTTCTGAATCCATCATAACCGGTATCGTCCTGATTTTGTTCGCATCCAGAGGTT
A H F L N P S Y R Y R P D F V P H P E V

730 740 750 760 770 780
GTACGAGGACTGAATGCATGCATTGTGCGATTGGAGCCAGACAATGCAAGAAGAATTTCT
V R G L N A C I V R L E P D N A R R I S

790 800 810 820 830 840
GCATCCATGCAAATATCAGATTTCAACTCTGCTTAAAGCTGATTTTGGAAACAGATTTGGC
A S M Q I S D F N S A - S - F W N R F G

850 860 870 880 890 900
ACTTAGCACCAGAACGGAGCTTAATCCTGCTGCTTGGTGGCAACAACATGGATAAATTGT
T - H Q N G A - S C C L V A T T W I N C

910 920 930 940 950 960
TAGAGCTCCACCGATAGCTGGACGAATACTAGCAGACTGTCACTTGCTGTGAGCACAATT
S S T D S W T N T S R L S L G V S T I

3/14

Fig. 1 (Blatt 3)

970 980 990 1000 1010 1020
GGAGTTATATCATCAGATCCACAGTCAGAGGCACAACCGTGTAGCACAGAAAGATTAAAC
G V I S S D P Q S E A Q P C S T E R L N

1030 1040 1050 1060 1070 1080
GATGTCACATACGTCCACTATAACCTGAGACTTAGGGATCGTCAGATAAGGAAAATGCCCT
D V T Y V H Y N L R L R D R Q I R K M P

1090 1100 1110 1120 1130 1140
ATCATCCAATTTTCCTCGATAGTGTCTGCAAGAAATTTGCTGTATGATTGGATTGTAGA
I I Q F S S I V F C K K F A V - L D C R

1150 1160 1170 1180 1190 1200
GTCAGAGAAACCAGTTTTTGCAAGACGATGAGGAAATGCTTTATAGTCAAATGGAAGTGGT
V R E T S F A R R - G N A L - - N G T G

1210 1220 1230 1240 1250 1260
GAGTATGAGAATGATTTTCATGGACCATGATGNTGGAAATNCANACTTAAGGAAGGGATCA
E Y E N D F M D H D X G N X X L R K G S

1270 1280 1290 1300 1310 1320
TTGGAGATGGTAACTTTAGCTGGTGAAGCAGAACCCCTAGAAGTTAATCCTGACAATACT
L E M V T L A G E A E P L E V N P D N T

1330 1340 1350 1360 1370 1380
GGTACAGCTACAGATGATGATTCTGATCTCAATTTTCTTGATAATGAGTTGAGTGATTAG
G T A T D D D S D L N F L D N E L S D -

1390 1400 1410 1420 1430 1440
TGCCTGAACCAGAACCCAAATGCACAGCAGTTAACATGTTTGGTAACCACTCAACTACT
C L E P E P K C T A V N M F G N H S T T

4/14

Fig. 1 (Blatt 4)

1450 1460 1470 1480 1490 1500
GGCAATGTATTCTATTATCGCAAGTCCTTTAGCTATCTCTCCCAATCACTTTCTTGGCAA
G N V F Y Y R K S F S Y L S Q S L S W Q

1510 1520 1530 1540 1550 1560
AATGTGCACTGCCAGTTGCGCGAGTGGGGACGGGAAAGCGGGGAAAAGTCGGAAAGAGCC
N V H C Q L G E W G R E R G E K S E R A

1570 1580 1590 1600 1610 1620
TGTGTAGAAGTTAGAGATCAGCATTACAGGAGGGCACTGGAGTGTACATGTCAAAGTACT
C V E V R D Q H Y R R A L E C T C Q S T

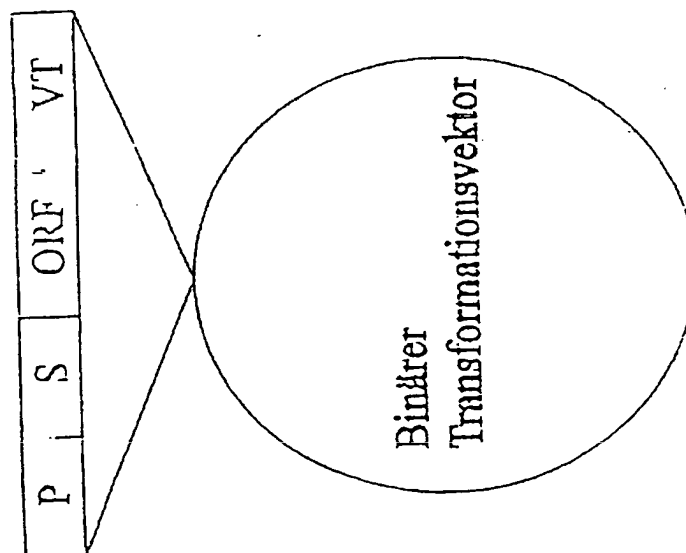
1630 1640 1650 1660 1670 1680
TCGTTTCTTAACCTCTCACTGTTTCATGTTTAGTCATTGTTTGCTCTTATTCAGTTTTCCT
S F L N L S L F M F S H C L L L F S F P

1690 1700
TCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
S K K K K K K

5/14

Fig. 2

P = spezifischer Promotor der Zielpflanze
S = Signalsequenz
ORF = Offener Leserahmen der Inhibitor-cDNA
VT = Vakuoläre Targetingsequenz



6/14

Fig. 3

10 20 30 40 50 60
AGAAAATCTAACTTTGGTTCTCTCTCTCTCTCTTTTCCAACTTCAAAAATGAAGAATTT
E N L T L V L S L L S F P T S K M K N L
70 80 90 100 110 120
GATTTTCCTAACGATGTTTCTGACTATATTACTACAAACAACGCCAATAATCTAGTAGA
I F L T M E L T I L L Q T N A N N L V E
130 140 150 160 170 180
AACTACATGCAAAAACACACCAAATTACCAACTTTGTCTGAAAACCTCTGCTTTTCGGACAA
T T C K N T P N Y Q L C L K T L L S D K
190 200 210 220 230 240
ACGAAGTGCAACAGGGGATATCACAACGTTGGCACTAATTATGGTCGATGCAATAAAAGC
R S A T G D I T T L A L I M V D A I K A
250 260 270 280 290 300
TAAAGCTAATCAGGCTGCAGTGACAATTTGAAACTCCGGCATTTCGAATCCCCCTGCAGC
K A N Q A A V T I S K L R H S N P P A A
310 320 330 340 350 360
TTGGAAAGGTCCTTTGAAAAACTGTGCCTTTTCATATAAGGTAATTTTAACAGCAAGTTT
W K G P L K N C A F S Y K V I L T A S L
370 380 390 400 410 420
CCCTGAAGCAATTGAAGCATTGACAAAAGGAGATCCAAAATTTGCTGAAGATGGAATGGT
P E A I E A L T K G D P K F A E D G M V
430 440 450 460 470 480
AGGTTTCATCTGGAGATGCACAAGAATGTGAGGAGTATTTCAAGGGTAGTAAATCACCATT
G S S G D A Q E C E Z Y F K G S K S P F
490 500 510 520 530 540
TTCTGCATTAAATATAGCAGTTTCATGAACCTTTCTGATGTTGGGAGAGCTATTGTCAGAAA
S A L N I A V H E L S D V G R A I V R N
550 560 570 580 590 600
TTTATTGTGATATATATGCACTACTCTTATACAAGTGTAACAATATTATCGATCAGAAAT
L L -
610 620 630 640
TTATTATGATGTGCCTGTGTATTACACACGTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

7/14

Fig. 4 A



B

1 2 3

INH

Fig. 5

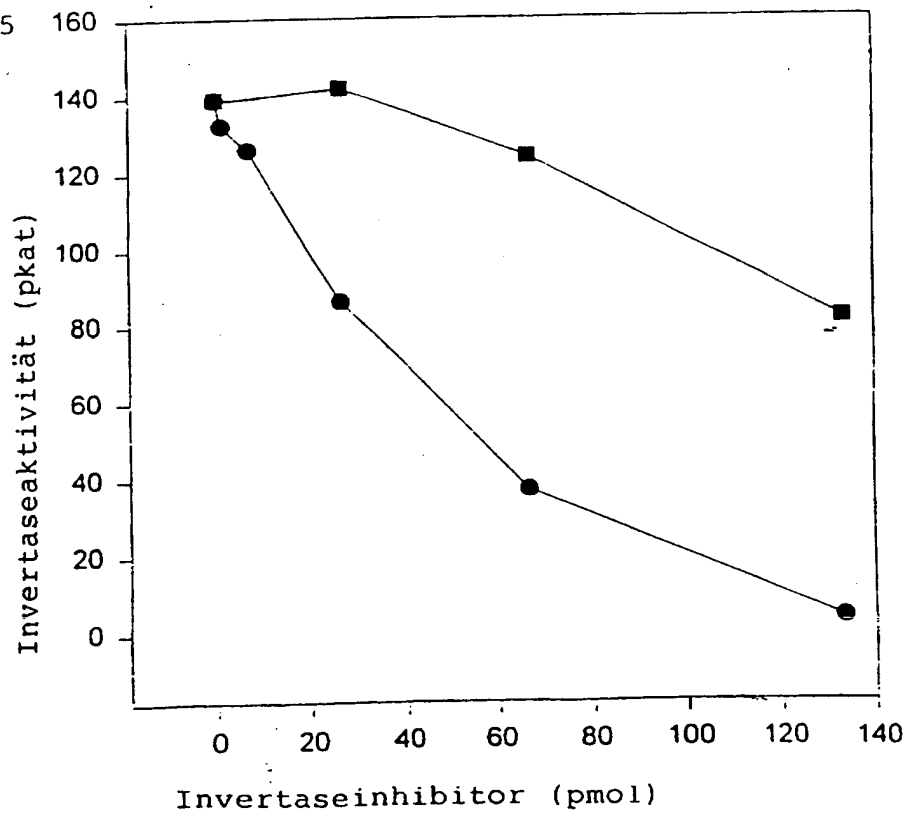


Fig.6

Induktion der Invertaseaktivität nach Verwundung

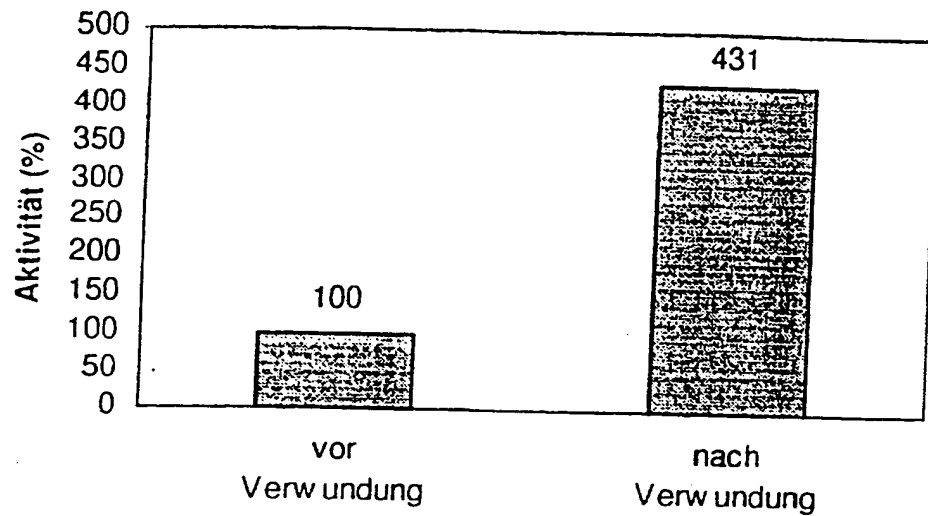
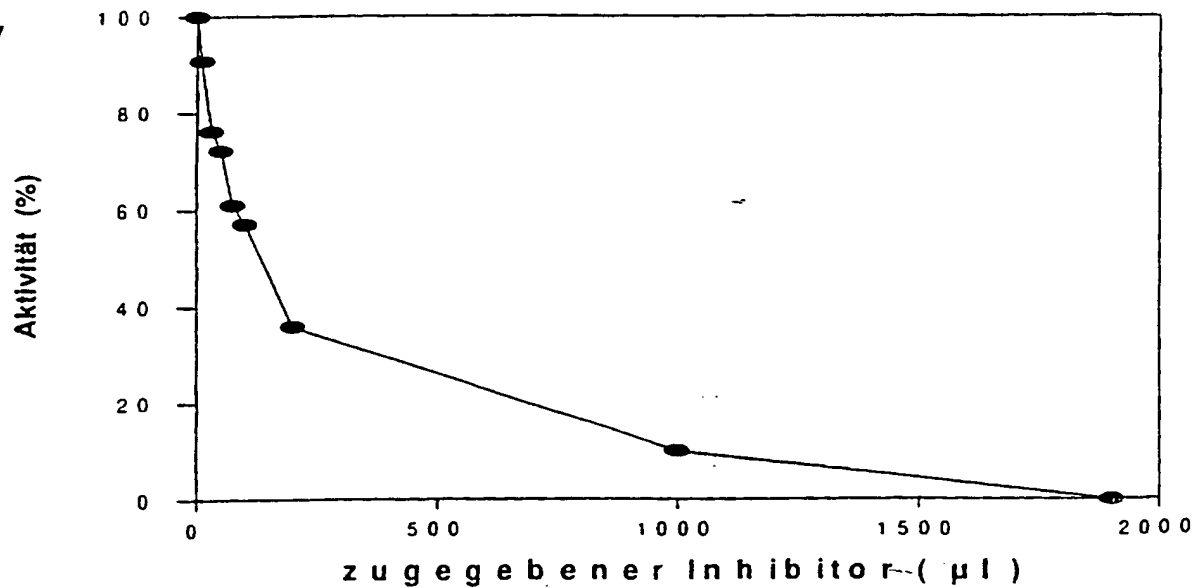
Inhibition der vakuolären Invertase aus *Beta vulgaris*
mit dem Inhibitor aus *N. tabacum*

Fig.7



9/14

Fig.8

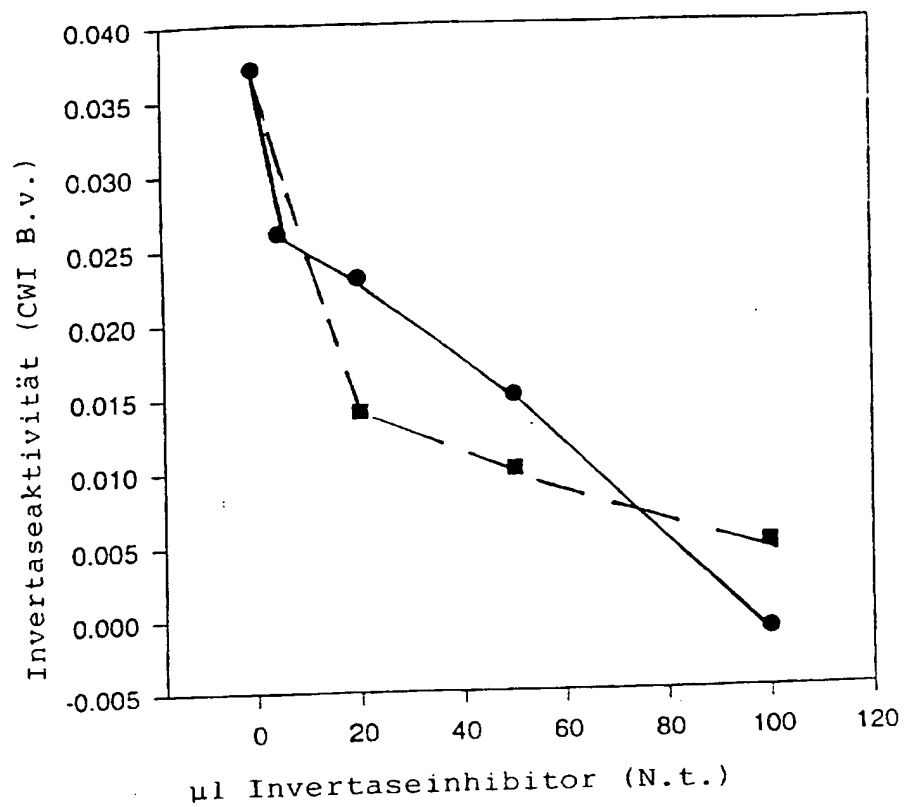
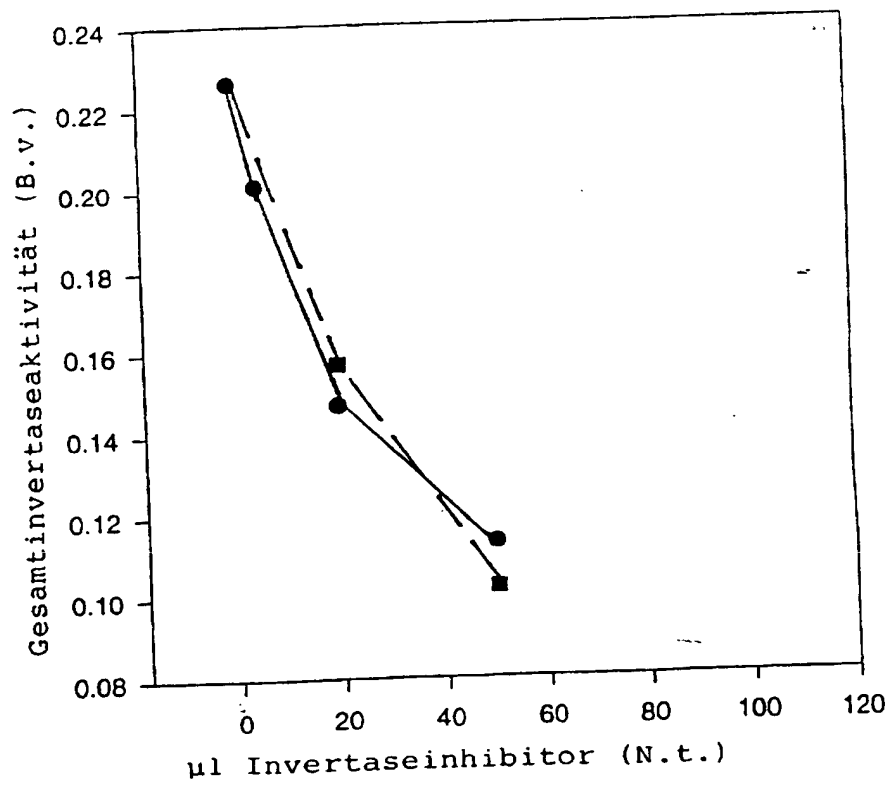


Fig.9



10/14

Fig.10

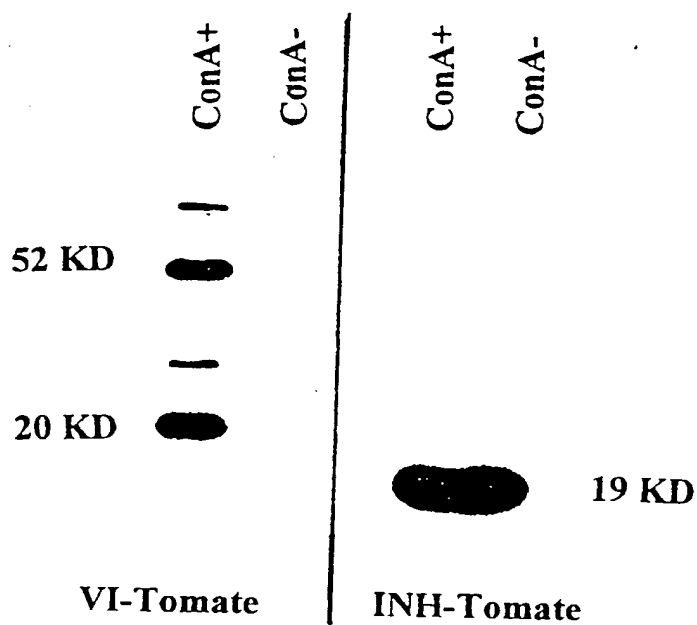
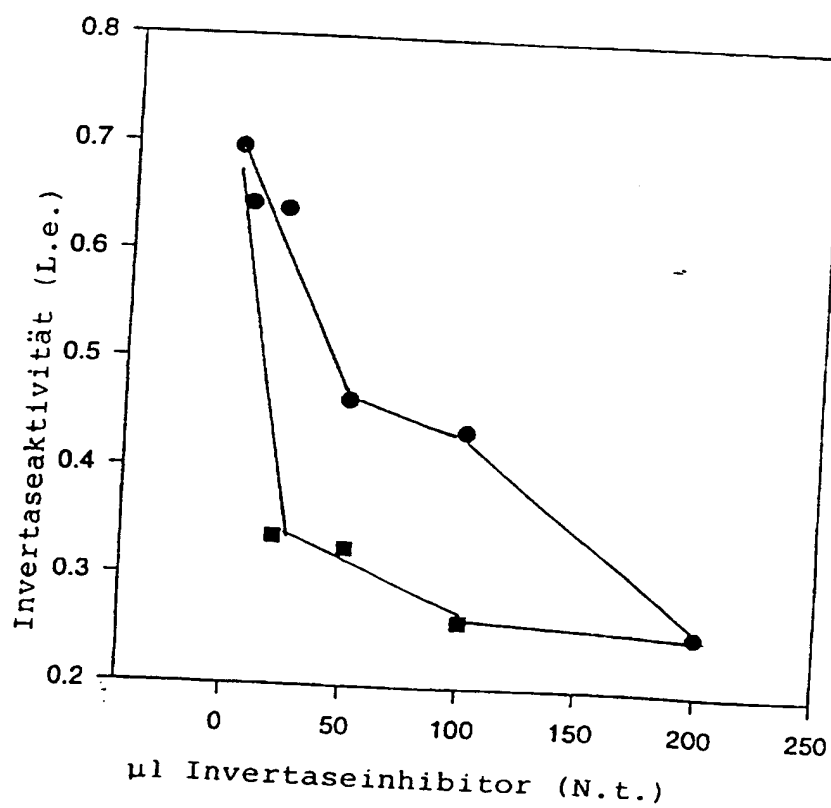


Fig.11



11/14

Fig. 12

10 20 30 40 50 60
| | | | |
AAGAACACACCGAATTACCATTTGTGTGTGAAAACCTTTGTCTTTAGACAAAAGAAGTGAA
K N T P N Y H L C V K T L S L D K R S E

70 80 90 100 110 120
| | | | |
AAAGCAGGAGATATTACAACATTAGCATTAAATTATGGTTGATGCTATTAAATCTAAAGCT
K A G D I T T L A L I M V D A I K S K A

130 140 150 160 170 180
| | | | |
AATCAAGCTGCTAATACTATTTCAAACTTAGGCATTCTAATCCTCCTCAAGCTTGGAAA
N Q A A N T I S K L R H S N P P Q A W K

190 200 210 220 230 240
| | | | |
GATCCTTTGAAGAATTGTGCCTTTTCGTATAAGGTAATTTTAACAGCAAGTATGCCAGAA
D P L K N C A F S Y K V I L T A S M P E

250 260 270 280 290 300
| | | | |
GCAATAGAAGCATTAAACAAAAGGTGATCCAAAATTTGCAGAAGATGGAATGGTCGGATCA
A I E A L T K G D P K F A E D G M V G S

TCAGGTG

S G

12/14

Fig.13

| | | |
|-------------|--|-----|
| Tomate-INH1 | -----KNTPNYHLCVKTLSLDKRSEKAGDITTLALIMVDAIKSKANQ | 4 |
| Tomate-INH1 | -----KNTPNYHLCVKTLSLDKRSEKAGDITTLALIMVDAIKSKANQ | 4 |
| Tabak-INH | NNLVETTCKNTPNYQLCLKTLLSDKRSA-TGDITTLALIMVDAIKAKANQ | 4 |
| | *****.***.***.****.*****.*****.*****.***** | |
| Tomate-INH1 | AANTISKLRHSNPPQAWKDPLKNCAFSYKVILTASMPEAIEALTKGDPKF | 9 |
| Tomate-INH1 | AANTISKLRHSNPPQAWKDPLKNCAFSYKVILTASMPEAIEALTKGDPKF | 9 |
| Tabak-INH | AAVTISKLRHSNPPAAWKGPLKNCAFSYKVILTASLPEAIEALTKGDPKF | 9 |
| | ** *****.***.*****.*****.*****.*****.***** | |
| Tomate-INH1 | AEDGMVGSSG----- | 102 |
| Tomate-INH1 | AEDGMVGSSG----- | 102 |
| Tabak-INH | AEDGMVGSSGDAQECEYFKGSKSPFSALNIAVHELSDVGRAIVRNLL | 147 |
| | ***** | |

13/14

Fig. 14 (Blatt 1/2)

CGGCACGAGAACAAAACCAACACCTTTCCTTTGGCCTCTCCTCCTTTTATCTTTTATAT
R H E N K T K H L S F G L S S F Y L L Y
CAATCCTCATCTTCAATAACACCACTCTCAAAACAAATGAGAACTTATTCCTCATATT
Q S S S S I T P L S K Q M R N L F P I F
ATGTTAATCACCAATCTAGCATTCAACGACAACAACAGTAATAATATCATCAACACG
M L I T N L A F N D N N N S N N I I N T
ACCTGCAGAGCCACCACAACTACCCCTTGTGCCTCACCACCCTCCACTCTGATCCCCGT
T C R A T T N Y P L C L T T L H S D P R
ACCTCCGAGGCCGAGGGGGCGGACCTCACCACCCTCGGCCTCGTCATGGTAGATGCGGTA
T S E A E G A D L T T L G L V M V D A V
AAATTAAAGTCCATCGAAATAATGAAAAGTATAAAAAAACTCGAAAAATCGAACCCCGAG
K L K S I E I M K S I K K L E K S N P E
TTGAGACTACCTCTTAGCCAATGTTACATAGTGTATTATGCTGTTCTACATGCTGATGTA
L R L P L S Q C Y I V Y Y A V L H A D V
ACTGTTGCTGTTGAAGCTTTAAAAAGAGGAGTCCCTAAATTTGCTGAAAATGGAATGGTT
T V A V E A L K R G V P K F A E N G M V

14/14

Fig. 14 (Blatt 2/2)

490 500 510 520 530 540
| | | | |
GATGTTGCTGTAGAAGCAGAACTTGTGAGTTTAGTTTTAAGTATAATGGATTGGTTTTCT
D V A V E A E T C E F S F K Y N G L V S

550 560 570 580 590 600
| | | | |
CCAGTTTCTGATATGAATAAGGAGATTATTGAACTGTCTTCTGTGGCTAAATCTATTATT
P V S D M N K E I I E L S S V A K S I I

610 620 630 640 650 660
| | | | |
AGAATGCTATTATGAGGAAATTAAAGAACCAAGATACAAGGTTCTGGTTATGTTAGTTT
R M L L

670 680 690 700 710 720
| | | | |
ATTAGTGCTGTAATAGGATTTTTATATTCCTGTGTTTTTTTTGCTTTTTTTATTCATTT

730 740 750 760 770 780
| | | | |
GGGTGCTTGTGTGTATATGTGAAAATGAGTGTGAATTATGTCAAACATAAACATAGATTA

790 800 810
| | |
GAAATTACTCCTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 97/04153

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/82 C07K14/415 C12Q1/68 C07K16/16 C12N1/21
C12N9/26 A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12N C07K C12Q A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|------------------------------------|
| X | SANDER, A., ET AL. : "SUCROSE PROTECTS CELL WALL INVERTASE BUT NOT VACUOLAR INVERTASE AGAINST PROTEINACEOUS INHIBITORS" FEBS LETTERS, vol. 385, 6 May 1996, pages 171-175, XP002049864 page 174, lines 21-27; page 171; page 172, left hand column --- -/-- | 1,3,5-7, 13, 16-18, 25,29 |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 December 1997

Date of mailing of the international search report

16. 01. 98

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Holtorf, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 97/04153

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|----------------------------|
| X | WEIL, M., ET AL . : "A 17-kDa NICOTIANA TABACUM CELL-WALL PEPTIDE ACTS AS AN IN-VITRO INHIBITOR OF THE CELL-WALL ISOFORM OF ACID INVERTASE" PLANTA, vol. 193, 1994, pages 438-445, XP002050466 page 443, left hand column; page 444, right hand column, last paragraph | 1,3,13, 18,22, 25,29 |
| X | --- PRESSEY, R.: "INVERTASE INHIBITOR IN TOMATO FRUIT" PHYTOCHEMISTRY, vol. 36, no. 3, 1994, pages 543-546, XP002050467 see the whole document | 1,5,18 |
| X | --- NEWMAN, T., ET AL . : "GENES GALORE: A SUMMARY OF METHODS FOR ACCESSING RESULTS FROM LARGE-SCALE PARTIAL SEQUENCING OF ANONYMOUS ARABIDOPSIS cDNA CLONES" EMBL SEQUENCE DATA LIBRARY, 28 August 1995, HEIDELBERG, GERMANY, XP002050468 ACCESSION No. R90356 | 6 |
| A | --- WO 96 12812 A (DANISCO ;KREIBERG JETTE DINA (DK); CHRISTENSEN TOVE MARTEL IDA EL) 2 May 1996 pages 1-2; page 3, lines 1-5; page 5, lines 25-30; page 6, lines 13-22; page 11, lines 25-30 | 1-30 |
| A | --- WO 93 06711 A (UNIV CALIFORNIA) 15 April 1993 see the whole document | 1-30 |
| A | --- EP 0 677 581 A (JAPAN TOBACCO INC) 18 October 1995 see the whole document | 1-30 |
| A | --- WO 92 14831 A (SALK INST BIOTECH IND) 3 September 1992 see the whole document | 7-24 |
| P,X | --- KRAUSGRILL, S., ET AL . : "REGULATION OF CELL WALL INVERTASE BY A PROTEINACEOUS INHIBITOR" JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY, vol. 47, August 1996, pages 1193-1198, XP002050469 see the whole document | 18,19,22 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 97/04153

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The polypeptide sequence, characterized by ID.SEC. No. 4 in claim 19, was read as ID.SEC. No. 5 of the submitted sequence list.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inter. Application No

PCT/EP 97/04153

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|--|--|
| WO 9612812 A | 02-05-96 | AU 2788295 A CA 2202895 A EP 0787192 A GB 2294266 A,B | 15-05-96 02-05-96 06-08-97 24-04-96 |
| WO 9306711 A | 15-04-93 | AU 2772792 A US 5658773 A | 03-05-93 19-08-97 |
| EP 0677581 A | 18-10-95 | CA 2147355 A WO 9505457 A | 23-02-95 23-02-95 |
| WO 9214831 A | 03-09-92 | AU 1456292 A BR 9205480 A EP 0573566 A HU 66831 A MX 9200751 A US 5576428 A US 5665579 A | 15-09-92 01-03-94 15-12-93 30-01-95 01-09-92 19-11-96 09-09-97 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/04153

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/82 C07K14/415 C12Q1/68 C07K16/16 C12N1/21
C12N9/26 A01H5/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N C07K C12Q A01H

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|------------------------------------|
| X | SANDER, A., ET AL. : "SUCROSE PROTECTS CELL WALL INVERTASE BUT NOT VACUOLAR INVERTASE AGAINST PROTEINACEOUS INHIBITORS" FEBS LETTERS, Bd. 385, 6.Mai 1996, Seiten 171-175, XP002049864 Seite 174, Zeile 21-27; Seite 171; Seite 172, linke Spalte --- -/- | 1,3,5-7, 13, 16-18, 25,29 |

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

17. Dezember 1997

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

16. 01. 98

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Holtorf, S

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/04153

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|----------------------------|
| X | WEIL, M., ET AL. : "A 17-kDa NICOTIANA TABACUM CELL-WALL PEPTIDE ACTS AS AN IN-VITRO INHIBITOR OF THE CELL-WALL ISOFORM OF ACID INVERTASE" PLANTA, Bd. 193, 1994, Seiten 438-445, XP002050466 Seite 443, linke Spalte; Seite 444, rechte Spalte, letzter Absatz --- | 1,3,13, 18,22, 25,29 |
| X | PRESSEY, R.: "INVERTASE INHIBITOR IN TOMATO FRUIT" PHYTOCHEMISTRY, Bd. 36, Nr. 3, 1994, Seiten 543-546, XP002050467 siehe das ganze Dokument --- | 1,5,18 |
| X | NEWMAN, T., ET AL. : "GENES GALORE: A SUMMARY OF METHODS FOR ACCESSING RESULTS FROM LARGE-SCALE PARTIAL SEQUENCING OF ANONYMOUS ARABIDOPSIS cDNA CLONES" EMBL SEQUENCE DATA LIBRARY, 28.August 1995, HEIDELBERG, GERMANY, XP002050468 ACCESSION No. R90356 --- | 6 |
| A | WO 96 12812 A (DANISCO ;KREIBERG JETTE DINA (DK); CHRISTENSEN TOVE MARTEL IDA EL) 2.Mai 1996 Seite 1-2; Seite 3, Zeile 1-5; Seite 5 ,Zeile 25-30; Seite 6, Zeile 13-22; Seite 11, Zeile 25-30 --- | 1-30 |
| A | WO 93 06711 A (UNIV CALIFORNIA) 15.April 1993 siehe das ganze Dokument --- | 1-30 |
| A | EP 0 677 581 A (JAPAN TOBACCO INC) 18.Oktober 1995 siehe das ganze Dokument --- | 1-30 |
| A | WO 92 14831 A (SALK INST BIOTECH IND) 3.September 1992 siehe das ganze Dokument --- | 7-24 |
| P,X | KRAUSGRILL, S., ET AL. : "REGULATION OF CELL WALL INVERTASE BY A PROTEINACEOUS INHIBITOR" JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY, Bd. 47, August 1996, Seiten 1193-1198, XP002050469 siehe das ganze Dokument ----- | 18,19,22 |

Formblatt PCT/ISA/210 (Fortsetzung von Blatt 2) (Juli 1992)

BNSDOCID: <WO_8804722A1_1_>

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/04153

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr. weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich Die Polypeptidsequenz, charakterisiert durch SEQ.ID. NO.4 in Patentanspruch 19, wurde gelesen als SEQ.ID. NO. 5 der eingereichten Sequenzliste.
2. ☐ Ansprüche Nr. weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr. weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen enthalten:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

Formblatt PCT/ISA/210 (Fortsetzung von Blatt 1 (1))(Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/04153

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|--|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| WO 9612812 A | 02-05-96 | AU 2788295 A | 15-05-96 |
| | | CA 2202895 A | 02-05-96 |
| | | EP 0787192 A | 06-08-97 |
| | | GB 2294266 A,B | 24-04-96 |
| WO 9306711 A | 15-04-93 | AU 2772792 A | 03-05-93 |
| | | US 5658773 A | 19-08-97 |
| EP 0677581 A | 18-10-95 | CA 2147355 A | 23-02-95 |
| | | WO 9505457 A | 23-02-95 |
| WO 9214831 A | 03-09-92 | AU 1456292 A | 15-09-92 |
| | | BR 9205480 A | 01-03-94 |
| | | EP 0573566 A | 15-12-93 |
| | | HU 66831 A | 30-01-95 |
| | | MX 9200751 A | 01-09-92 |
| | | US 5576428 A | 19-11-96 |
| | | US 5665579 A | 09-09-97 |